

| 学 位 論 文 要 旨<br>(Summary of the Doctoral Dissertation) |  |
|---|--|
| 学位論文題目<br>(Dissertation Title)                        | THERMODYNAMIC STUDY OF BIOMOLECULES RETENTION<br>MECHANISM IN CHROMATOGRAPHY<br>(クロマトグラフィーにおける生体分子保持機構の熱力学的解析) |
| 氏 名 (Name)  | Joao Carlos Simoes Cardoso   |

Protein adsorption at solid surfaces plays a key role in many natural processes and has therefore promoted a widespread interest in many research areas. Despite considerable progress in this field reviewed in the first chapter, there are still widely differing and even contradictory opinions on how to study and explain observed adsorption phenomena. Thermodynamic analysis of protein adsorption is essential for understanding the binding mechanism and the future design of new separation processes. However, thermodynamic data for proteins adsorption are scarcely available. This study sheds light over the adsorption behavior of molecules onto polymeric chromatography particles.

In the second chapter, temperature effect on the adsorption enthalpy of polyphenols is analyzed. In this chapter, a new method developed in this thesis allows for the enthalpy determination using a linear gradient elution mode, instead of the more commonly used, isocratic elution mode. Resulting in a more robust method and requiring less estimations a priori, while still providing an accurate way to compare enthalpy of adsorption for different molecules. Enthalpy values determined by this novel method are consistent with the values directly measured with isothermal titration calorimetry (ITC), with some exceptions.

In the third chapter, a more complex adsorption mechanism is analyzed. The adsorption of model proteins is analyzed onto ion exchange chromatography (IEC) resins by using ITC to search the answer for the question "why do proteins adsorb?". As a study system, two similarly charged basic proteins with similar molecular weight, cytochrome c (CytC) and lysozyme (Lys) adsorbing onto cation-exchange chromatography resins was chosen. In a chromatographic column, the retention volume of Lys was larger than that of CytC. When the temperature increased, the retention volume of CytC slightly increased, whereas that of Lys slightly decreased. This indicates that a more complex mechanism of adsorption may be involved. Large exothermal enthalpies of adsorption were observed when Lys adsorbed onto the cation exchanger. The Lys adsorption was found to be enthalpically driven. On the other hand, endothermic enthalpies were dominant for CytC adsorption, which was entropically driven. This indicates that structural rearrangements, dehydration and release of counter-ions play a major role in CytC adsorption. This is a great example that even similar proteins can have opposite driving forces when adsorption onto the same chromatographic surface. While trying to answer a simple question, a new, more complicated question now emerges "why do similar proteins have different driving forces when adsorbing?". Each circumstance is a quite unique and we are still very far from a general overarching hypothesis when it comes to the molecular forces that drive protein adsorption.

In the fourth chapter, thermodynamic techniques were used to study more recently developed chromatography resins: surfaces with grafted-layer ligands. These surfaces were developed to increase the maximum capacity and mass transfer properties in chromatography, with the goal of improving the efficiency and productivity of protein purification. However, a thorough thermodynamic study has yet to be published comparing different types of ligand architecture. In this study, not only the thermodynamic parameters were obtained but these were related with chromatographic data. It was found that the salt needed for protein adsorption on a linear gradient elution is related with the change of enthalpy upon adsorption. Data indicates that bovine serum albumin (BSA) adsorption enthalpy in grafted-layer surfaces varies between exothermic energies ( $\Delta h^0 < 0$ ) and endothermic ( $\Delta h^0 > 0$ ). Solely changing the grafted-layer ligand design, the main interactions between the protein and the chromatographic surface can vastly differ from being entropic or enthalpically

様式7号 (第12条, 第31条関係)

(様式7号) (Format No.7) 英語版

driven.

However, despite the extensive effort of the scientific community, the understanding of protein adsorption remains incomplete. Discrepancies, contradictions and even conflicting views persist concerning such fundamental issues as the nature of driving forces of protein adsorption. Which main reasons have been thoroughly pointed out in this study. Because of its vital significance, protein adsorption is studied here, both experimentally and theoretically. The study as a whole may be useful, but not limited to, the development of new chromatographic surfaces and develop novel downstream processing systems.

(和文 2,000 字程度 / 英文 800 語程度)  
(about 800 words)

(様式 9 号)

## 学位論文審査の結果及び最終試験の結果報告書

山口大学大学院創成科学研究科

|   |  |
|---|--|
| 氏 名   | Joao Carlos Simoes Cardoso   |
| 審 査 委 員   | 主 査：吉本 則子  |
|   | 副 査：堤 宏守   |
|   | 副 査：赤田 倫治  |
|   | 副 査：鬼村 謙二郎   |
|   | 副 査：田中 一宏  |
|   | 副 査：山本 修一  |
| 論 文 題 目   | THERMODYNAMIC STUDY OF BIOMOLECULES<br>RETENTION MECHANISM IN CHROMATOGRAPHY<br>(クロマトグラフィーにおける生体分子保持機構の熱力学的解析) |
| <p>【論文審査の結果及び最終試験の結果】</p> <p>クロマトグラフィーはタンパク質医薬品の主要な分離精製技術である。近年、抗体医薬品をはじめとしてタンパク質医薬品の需要が大幅に増加しており、短時間で高吸着量を達成するクロマトグラフィー分離剤あるいはそれらを利用したプロセスの開発が急務の課題となっている。</p> <p>本研究では、クロマトグラフィーにおけるタンパク質の吸着現象を熱力学的に解明することを目的とし、第 1 章ではクロマトグラフィー分離における結合モデルと熱量測定法について、基礎となる原理と応用例についてまとめた。</p> <p>第 2 章では、等温滴定カロリーメトリー-ITC を用いて、分離剤内のリガンドに低分子化合物 poly phenols 類が吸着する際の微小な熱量変化を測定可能であることを明らかにした。また、従来のクロマトグラフィーを用いた熱力学的解析手法により得られたエンタルピー値と ITC で得られた値がほぼ一致することも示した。</p> <p>第 3 章では、吸着等温線から得られる吸着量に基づきタンパク質 1 分子当たりの自由エネルギー変化を決定した。これらと ITC で得られたエンタルピー値に基づいて吸着に伴うタンパク質のエントロピーの各変化を定量的に解析できることを明らかにした。また、2 種類のモデルタンパク質の吸着現象について、エンタルピー値およびエントロピー値の正負が各タンパク質を構成するアミノ酸組成と分子の剛直性により決定されることを示した。これらの熱力学的特性は、クロマトグラフィーによるタンパク質分離の温度依存性と関連していることを明らかにした。</p> <p>さらに、第 4 章では、グラフト型リガンドをもつ分離剤において、その結合容量に及ぼす熱力学的性質の寄与とリガンド構造との関係を明らかにした。本研究で得られた知見は、生体分子を対象とする分離プロセスの最適化のみならず新規分離剤の開発や精密分離プロセスの設計に寄与することが期待される。</p> |  |

公聴会では本学の教員、学生に加えて海外のクロマトグラフィー関連の研究者が web 参加し、活発な質疑応答がなされた。主な質問を以下にまとめる。

- (1) 生体組織へのタンパク質の吸着現象の解析にも応用できるのか
- (2) 現在の回分式測定系で得られた結果を流通式の測定法に拡張できるのか
- (3) 疎水クロマト等の異なるモードの分離剤でも、同様の結果が得られるのか

これらの質問に対して、申請者より適切に回答が行われた。

以上より、本研究は独創性、新規性に優れ、博士(学術)論文に十分値するものと判定した。

論文内容及び審査会、公聴会での質問に対する応答などから、最終試験は合格とした。

なお、主要な関連論文の発表状況は下記のとおりである。

#### 関連論文 計 3 編

- 1) Joao C. Simoes-Cardoso, Noriko Yoshimoto, Shuichi Yamamoto,  
'Thermodynamic analysis of polyphenols retention in polymer resin chromatography by van't Hoff plot and isothermal titration calorimetry, Journal of Chromatography A, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460405>
- 2) Joao CARDOSO, 吉本 則子, 山本 修一,  
'クロマトグラフィー分離における分配係数の温度依存性の熱力学的解析方法',  
日本食品工学会誌, 20(3), 99-105, (2019)
- 3) Joao C. Simoes-Cardoso, Nanako Hoshino, Noriko Yoshimoto, Shuichi Yamamoto,  
'Isothermal titration calorimetry as a method for analyzing protein adsorption in ion exchange chromatography', Proceedings of APCCHE 2019, MATEC Web of Conferences